

木黴菌及枯草桿菌防治設施高莖萎凋病研究

姚瑞禎、葉俊巖

摘 要

本研究旨在探討利用木黴菌及枯草桿菌等微生物防治設施高莖萎凋病之效應，期解決設施栽培高莖萎凋病之問題。自田間分離篩選出拮抗效果較佳的木黴菌與枯草桿菌，並利用液態培養大量增殖後，分別以種子預措、添加於介質後育苗、田間噴施及拮抗菌堆肥施用等方式為處理。試驗結果顯示，播種後以孢子懸浮液直接噴施防治效果不佳，種子預先以木黴菌預措後播種亦無防治效果，但以木黴菌添加於滅菌介質育苗後移植，則有較佳的防治效果。

關鍵詞：鐮孢菌、萎凋病、生物防治、木黴菌、枯草桿菌、高莖。

前 言

北部地區葉菜類蔬菜，農民普遍採行集約栽培，因此化學肥料及農藥之使用量亦逐年增加，由鐮孢菌造成之病害如芹菜與蘿蔔之黃葉病、十字花科蔬菜之萎凋病等愈來愈嚴重(黃，1991)，鐮孢菌在台灣危害較重要的作物已超過二十種以上(Sun et al., 1985)。北部地區設施栽培之小葉菜類受鐮孢菌危害之情形尤其嚴重，其中高莖(黃等，1998；羅等，1998)與芹菜受害最嚴重，其他如白菜、芥菜、菠菜等亦少量發生萎凋病。施用土壤添加物防治土傳性病害，已有許多成功之例子，例如添加甘藍、芥菜、芥藍等之菜渣於土壤中，可顯著降低豌豆根腐病的發生(Lewis et al., 1971)；添加成熟大麥桿，能有效抑制豆類根腐病(Snyder et al., 1959)；添加紫花苜蓿除了可減輕白絹病菌之危害外，亦可降低其他由疫病菌及鐮孢菌等造成的根部病害。關於應用拮抗微生物防治萎凋病在番茄(Cotxarrera et al., 2002)及豆類(Landa et al., 2004)也有實際例子。

本場自 2001 至 2002 年針對北部地區設施栽培葉菜類以電話訪問、班會時間卷調查及實地進行調查，結果設施葉菜類病害夏季以高莖受害最嚴重，主要為萎凋病，常造成產量減少，嚴重時失去商品價值，冬季則以菌核病為主，芹菜則是以萎凋病較為嚴重。其餘蔬菜之苗立枯病僅局部發生，而露菌病部份農友以藥劑防治，較少造成栽培上的問題。設施經 3-4 年種植後，常發現蔬菜植株矮小生長停滯現象，普遍發生於白菜、高莖、芥菜及少部分莧菜，薤菜及菠菜較少發生；該等生長停滯矮小之植株，經組織分離培養結果非病害所造成；再經土壤採樣分析 EC 值偏高，係造成蔬菜根部生長受阻的主要原因。

北部地區設施葉菜類主要分布於桃園縣，其萎凋病發生較嚴重地區為八德市、蘆竹鄉及桃園市，

主要發生於種植三年以上的設施，且現場調查發現萎凋病皆開始發生於設施入口處，而後向內呈現縱向分布。依據 2002 年調查資料分析，連作五年以上之設施發生率達 36%，其中又以桃園市、八德市與蘆竹鄉設施所種植之茼蒿萎凋病發生最為嚴重，發病率 50% 以上者佔 6 成。

本研究以田間分離出之拮抗菌，增殖後施用於田間進行防治試驗，期解決設施栽培茼蒿萎凋病之問題。

材料與方法

1. 土壤微生物檢測

採用稀釋平板法，將土壤風乾後秤取 10 g 土壤，添加 90 ml 無菌水混合均勻後，自此稀釋液中再取 10 ml，添加 90 ml 無菌水混合均勻，進行系列稀釋，最後將稀釋液取出 1 ml 散佈於培養皿上，真菌採用 Peptone-rose bengal agar 培養基(Dhingra et al.1985)，放線菌則是用 Starch-Casein agar 培養基(Dhingra et al.1985)，細菌採用微生物計量管(Cult-Dip Combi Merck.)，鐮孢菌則是以 PCNB Agar 培養基(Komada, 1975)估算族群數。

2. 土壤拮抗微生物分離篩選

由土壤中分離出之微生物，與鐮孢菌進行對峙培養或共同培養，挑選效果佳的拮抗菌。

3. 滲調對茼蒿種子發芽之影響

於 2004 年 3 月及 6 月將葉茼蒿種子拌入含水 1、2、4 及 8 % 之河砂後，分別於 15、20、25℃ 及室溫滲調，不滲調為對照，24 小時後取出種子以 DBGM 發芽測定器檢測，比較各處理之發芽率與胚根長。

4. 生物製劑防治茼蒿萎凋病效果試驗

- (1) 木黴菌及枯草桿菌防治萎凋病試驗：篩選出對茼蒿萎凋病病原菌有拮抗作用之木黴菌(*Trichoderma* spp.)，以液態培養增殖，播種後噴施孢子懸浮液方式施用；枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)以市售商品稀釋後噴施於土壤表面方式施用。試驗處理：第一次(2003 年)枯草桿菌稀釋 700 倍、1,000 倍及木黴菌厚膜孢子 2×10^8 CFU g⁻¹ 稀釋 100 倍、200 倍及以噴施清水為對照 5 處理。第二次(2004 年)枯草桿菌稀釋 700 倍、木黴菌厚膜孢子 2×10^8 CFU g⁻¹ 稀釋 100 倍、200 倍及以噴施清水為對照 4 處理。試驗採逢機完全區集設計，4 重複，小區面積 10 m²。
- (2) 拮抗菌種子預措防治萎凋病試驗：主區茼蒿種子以木黴菌、枯草桿菌及清水進行預措 24 小時，種子不處理為對照；副區土壤施用木黴菌堆肥及枯草桿菌堆肥，不處理為對照。試驗採裂區設計，4 重複，小區面積 10 m²。
- (3) 育苗介質(BVB4)接種木黴菌防治萎凋病試驗：以介質滅菌添加木黴菌、介質不滅菌添加木黴菌、介質不滅菌不添加木黴菌及介質滅菌不添加木黴菌為處理，另以種子直播不接種木黴菌為對照(CK)，並採育苗移植方式種植，成活後每隔 7 天再噴施木黴菌孢子懸浮液，連續 2 次，試驗

採逢機完全區集設計，5 處理，4 重複，小區面積 10 m^2 。

- (4) 種子接種木黴菌及枯草桿菌防治萎凋病試驗：以木黴菌分生孢子($2 \times 10^8\text{ CFU g}^{-1}$)100 倍、木黴菌厚膜孢子 100 倍、市售枯草桿菌(10^9 CFU g^{-1}) 800 倍及枯草桿菌(10^8 CFU g^{-1}) 100 倍稀釋液為處理，並以噴施清水為對照，接種木黴菌之處理種子事先以木黴菌($2 \times 10^6\text{ CFU g}^{-1}$)混拌泥炭土預措 (Priming) 24 小時。木黴菌及枯草桿菌稀釋液噴施量 0.5 l m^{-2} 。試驗採逢機完全區集設計，4 重複，小區面積 10 m^2 。

5. 病害調查

以目測方式調查田間罹病株數，除以總調查株數，換算成罹病度。

結果與討論

1. 土壤微生物檢測

檢測結果設施土壤真菌種類中以 *Penicillium* spp.、*Aspergillus* spp.、*Trichoderma* spp.、*Rhizopus* spp.、*Fusarium* spp.、*Chaetomium* spp.、*Rhizoctonia* spp. 最為常見，其他水生菌類(無隔膜菌絲)亦常出現在培養基上。

土壤微生物族群中真菌數約有 10^4 - 10^6 CFU g^{-1} ，細菌 10^7 - 10^9 CFU g^{-1} ，放線菌 10^6 - 10^7 CFU g^{-1} ，鐮孢菌族群數則為 5×10^3 至 $1.2 \times 10^5\text{ CFU g}^{-1}$ 。高苣蔕生育期間土壤中鐮孢菌族群變動情形如圖 1 所示，前一期作(年)未種植高苣蔕者，病原菌族群較低，連續種植高苣蔕者病原菌族群較高，病原菌族群在播種後約 21 天漸漸升高，應與田間發病後於病株上增殖有關。一般而言，最早出現病徵的時間，約在播種後 20 至 30 天左右，若植株苗期受感染，設施內又太潮溼，極容易在萎凋植株上觀察到白色的絨毛狀物，有時也可觀察到粉紅色或橘色粉末，為鐮孢菌的分生孢子堆。

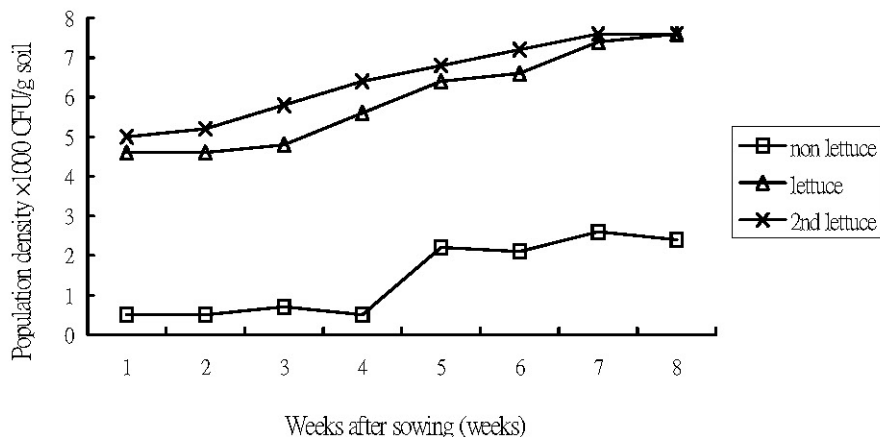


圖 1. 高苣蔕萎凋病試驗田病原菌族群變化

Figure 1. The population dynamics of *Fusarium oxysporum* in field.

依據高苳感染萎凋病程度之不同，分別採取設施內土壤檢測镰孢菌與木黴菌，結果以八德市、桃園市及蘆竹鄉設施土壤镰孢菌族群數較高，而木黴菌則相對稀少，低於 10^2 CFU g^{-1} ，甚至無法檢出(表 1)。

表 1. 設施內土壤镰孢菌與木黴菌族群檢測結果

Table 1. Population density of *Fusarium* and *Trichoderma* in wilt disease infested and non- infested region.

微生物種類 Major flora	萎凋病感染區 Infested region					萎凋病非感染區 Non-infested region		
	桃園市-1 Taoyuan City-1	桃園市-2 Tao Yuan City-2	八德市-1 Bade City-1	八德市-2 Bade City-2	蘆竹鄉 Luchu Hsiang	中壢市 Chunli City	平鎮市-1 Pinchen City-1	平鎮市-2 Pinchen City-2
<i>Fusarium</i>	++++*	+++	+++++	+++++	+++	+	++	+
<i>Trichoderma</i>	—	—	—	—	+	++	++	++++

* : +: <10 g^{-1} , ++: 10^2 g^{-1} , +++: 10^3 g^{-1} , ++++: 10^4 g^{-1} , +++++: $>10^4$ g^{-1} ,
—: Non detectable.

2. 土壤拮抗微生物分離篩選

拮抗菌篩選結果，自 185 個土樣中分離出 16 個拮抗菌株，主要以木黴菌(*Trichoderma* spp.)6 株、黏帚黴菌(*Gliocladium* spp.)2 株及假單胞細菌(*Pseudomonas* spp.)4 株三屬為主，其他枯草桿菌(*Bacillus* spp.)1 株、毛殼菌 (*Chaetomium* spp.) 1 株及擔子菌類 (菌絲具扣子體) 2 株，其中以木黴菌拮抗效果最佳，生長速度快且於平板培養基對峙培養效果明顯。

3. 滲調對高苳種子發芽之影響

高苳種子經 15、20、25℃ 及 3 月之室溫滲調處理，拌入含水 1、2、4 及 8% 之河砂，在 24 小時內發芽率均達 100%，且胚根長為 5 ± 0.1 mm，處理間無顯著差異；而 6 月之室溫滲調，24 小時內發芽率較差，約在 75% 至 90% 之間，但仍較對照 34% 為高。種子經拌含水 1% 之砂滲調，除了發芽整齊外，同時消除了機械播種時黏附之情形，不經滲調處理乾燥之種子，則因靜電黏附機械而造成缺株，含水 2% 以上之砂滲調，雖然可改善發芽整齊度，但亦會有黏附機械之情形；而含水 8% 之砂滲調，則發芽反而不整齊。因此葉高苳種子播種前，以含水 1% 之砂於 25℃ 進行滲調為較好之選擇(表 2)。

表 2. 不同含水量之砂於不同溫度滲調對高苣種子發芽之影響

Table 2. Effect of moisture content of priming medium and temperature on germination of lettuce seeds.

滲調介質含水量(%) Moisture content of priming medium (%)	24 小時發芽率(%) Germination rate in 24 hr (%)				
	15°C	20°C	25°C	22-26 ⁽¹⁾ °C	25-30 ⁽²⁾ °C
1	100	100	100	100	90
2	100	100	100	100	85
4	100	100	100	100	75
8	100	100	100	100	80
對照 Check	70	90	95	95	34

註：(1): 3 月之室溫(room temperature during March)；(2): 6 月之室溫(room temperature during June)

4. 生物製劑防治高苣萎凋病效果試驗

- (1) 木黴菌及枯草桿菌防治萎凋病試驗：高苣播種後噴施枯草桿菌及木黴菌防治萎凋病試驗於 2003 及 2004 年進行 2 次試驗，試驗結果如表 3 所示，第一次試驗部分區塊高苣植株矮小，經採樣檢查並未受到镰孢菌感染，但土壤電導度 (EC) 高，判斷為高苣植株生長矮小的主要原因。第二次試驗結果以木黴菌較佳，但因田間發病不均勻，以致防治效果並不顯著，經統計結果，與對照區及枯草桿菌處理間並無顯著差異。

表 3. 木黴菌及枯草桿菌防治萎凋病效果

Table 3. The effect of *Bacillus* and *Trichoderma* as biocontrol agents on disease incidence.

處理別 Treatment	罹病度 Disease severity			
	2003 年		2004 年	
<i>Bacillus</i> spp. 700X	86.25±	11.82 a	85.50±	11.15 a
<i>Bacillus</i> spp. 1000X	79.00±	21.71 a	—	—
<i>Trichoderma harzianum</i> 100X	68.00±	36.14 a	80.00±	13.64 a
<i>Trichoderma harzianum</i> 200X	88.25±	12.60 a	75.00±	22.73 a
Check	76.25±	31.07 a	85.00±	9.27 a

同行相同英文字母者表示鄧肯氏多變域測驗在 5%水準差異不顯著。

Mean values within column followed the same letter are not significant by DMRT at 5% probability level.

- (2) 拮抗菌種子預措防治萎凋病試驗：以拮抗菌進行種子預措，播種後田間高苣種子發芽均勻，但播種三週後即開始發病，六週後調查，種子以木黴菌或枯草桿菌預措之處理無明顯降低發病率；但施用木黴菌堆肥與枯草桿菌堆肥處理之罹病度分別為 46 與 50，而對照區之罹病度為 54，木黴菌處理之發病率較輕微，經統計分析，與對照處理間雖達 5%顯著差異(表 4)，但無實質效益。

表 4. 種子預措後施用拮抗菌堆肥防治萎凋病效果

Table 4. The effect of biocontrol agents composting on disease incidence.

處理別 Treatment	罹病度 Disease severity
<i>Trichoderma</i> Compost	46.00±1.25 a
<i>Bacillus</i> Compost	50.25±2.00 ab
Check	54.25±3.25 b

同行相同英文字母者表示鄧肯氏多變域測驗在 5%水準差異不顯著。

Mean values within column followed the same letter are not significant by DMRT at 5% probability level.

- (3) 育苗介質接種木黴菌防治萎凋病試驗：萵苣播種後 56 天調查萎凋病之罹病度，結果介質滅菌添加木黴菌處理 14.8±2.9；不滅菌添加木黴菌處理 18.5±3.7；滅菌不添加木黴菌處理 25.6±2.7；不滅菌不添加木黴菌處理則為 20.9±4.3，直播(對照)為 21.1±2.4。經統計分析結果顯示，區集間萎凋病發生情形差異未達顯著水準(表 5)，但處理間則差異顯著。

播種後 70 天調查各處理罹病度，介質滅菌添加木黴菌處理 18.6；不滅菌添加木黴菌處理 22.4；滅菌不添加木黴菌處理 29.6；不滅菌不添加木黴菌則為 24.9；直播(對照)為 26.4，經統計分析結果顯示，處理間差異顯著(表 5)。

表 5. 育苗介質接種木黴菌防治對萎凋病之效果

Table 5. The effect of adding *Trichoderma* to nursery medium on disease incidence.

處理別 Treatment	播種後 56 天罹病度 Disease severity	播種後 70 天罹病度 Disease severity
介質滅菌添加木黴菌 <i>Sterilized medium with Trichoderma</i>	14.8±2.9 a	18.6±3.1 a
介質滅菌不添加木黴菌 <i>Sterilized medium without Trichoderma</i>	20.9±4.3 b	24.9±6.3 bc
介質不滅菌添加木黴菌 <i>Raw medium with Trichoderma</i>	18.5±3.7 ab	22.4±2.7 ab
介質不滅菌不添加木黴菌 <i>Raw medium without Trichoderma</i>	25.6±2.7 c	29.6±3.1 c
直接播種 <i>Direct sowing</i>	21.1±2.4 b	26.4±4.7 bc

同行相同英文字母者表示鄧肯氏多變域測驗在 5%水準差異不顯著。

Mean values within column followed the same letter are not significant by DMRT at 5% probability level.

介質添加木黴菌育苗移植可以減少高莖萎凋病的感染，而介質滅菌接種木黴菌又較介質不滅菌效果為佳。作用機制應與延後田間接觸病原菌時間，及有較充足時間可以供木黴菌於根系固著等有關，進而達到保護根系，延緩病原菌的侵染。

- (4) 種子接種木黴菌及枯草桿菌防治萎凋病試驗：高莖播種後八週調查結果，各處理平均罹病度木黴菌分生孢子 100 倍稀釋液 72.5，木黴菌厚膜孢子 100 倍稀釋液 76.25，枯草桿菌商品(10^9 CFU/g) 800 倍 80.75，枯草桿菌(10^8 CFU/g) 100 倍 74，對照 82。雖然施用拮抗菌孢子懸浮液平均罹病度皆較對照組低，但因田間發病不均勻，造成極大差異，經統計分析結果皆未達顯著差異(表 6)。

表 6. 種子接種木黴菌及枯草桿菌防治萎凋病效果

Table 6. The effect of spraying antagonist spore suspension on disease incidence.

處理別 Treatment	罹病度 Disease severity
木黴菌分生孢子 2×10^6 CFU ml ⁻¹ <i>Trichoderma conidia</i>	72.5±13.25
木黴菌厚膜孢子 2×10^6 CFU ml ⁻¹ <i>Trichoderma chlamydospore</i>	76.25±16.5
台灣寶 8×10^7 CFU ml ⁻¹ BioBac <i>Bacillus subtilis</i>	80.75±10.5
枯草桿菌 10^7 CFU ml ⁻¹ <i>Bacillus</i> spp.	74±11.25
對照 Check	82±8.25

變方分析結果在 5% 水準差異不顯著。

Result of ANOVA test means are not significantly different at 5% level.

參考文獻

- 孫守恭、黃振文。1983。土壤添加物防治西瓜蔓割病之研究。植保會刊 25:127-137。
- 孫守恭、黃振文。1985。土壤添加物防治鐮孢菌萎凋病之機制。植保會刊 27:159-169。
- 黃振文。1991。利用土壤添加物防治作物之土壤傳播性病害。植保會刊 33:113-123。
- 黃晉興、羅朝村。1998。台灣萵苣萎凋病之調查初報。植病會刊 7: 150-152。
- 彭玉湘、黃振文。1998。萵苣萎凋病菌的病原性測定。植病會刊 7:121-127。
- 羅朝村、孫守恭。1987。蘿蔔黃葉病菌在發病田中之分布與消長。植保會刊 29:109-116。
- Amir, H. and C. Alabouvette. 1993. Involvement of soil abiotic factors in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilts. *Soil Biol. Biochem.* 25:157-164.
- Bowers, J. H. and J. Locke. C. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of fusarium wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* 84:300-305.
- Cal, A. de., S. Pascual. and P. Melgarejo. 1997. A rapid laboratory method for assessing the biological control potential of *Penicillium oxalicum* against *Fusarium* wilt of tomato *Plant Path.* 46:699-707.
- Cotxarrera, L., M. I. Trillas-Gay, C. Steinberg. and C. Alabouvette. 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil bio. biochem.* 34:467-476.
- Dhingra, O. D. and J. B. Sinclair. 1985. Basic plant pathology methods. 355pp. CRC Press. Florida.
- Huang, J. W., S. K. Sun. and W. H. Ko. 1983. A medium for Chlamydospore formation in *Fusarium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49:704-708.
- Johnson, S. P. 1953. Some factors in the control of the southern blight organism, *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 43:363-368.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8:114-125.
- Landa, B. B., J. A. Navas-Cortes. and R. M. Jimenez-Diaz. 2004. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.
- Lewis, J. A., and G. C. Papavizas. 1971. Effect of sulfur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 61:208-214.
- Serra-Wittlign, C., S. Houot. and C. Alabouvette. 1996. Increased soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax after addition of municipal solid waste compost. *Soil Bio. & Biochem.* 28:1207-1214.
- Snyder, W. C., M. N. Schroth. and T. Christou. 1959. Effect of plant residues on root rot of bean. *Phytopathology* 49:755-756.
- Sun, S. K. 1975. Ecology of pathogenic *Fusarium* in soil. *Plant Prot. Bull.* 17:217-232.
- Sun, S. K. and J. W. Huang. 1985. Formulated soil amendment for controlling *Fusarium* wilt and other soil-borne diseases. *Plant Dis.* 69:917-920.

Studies on *Trichoderma* and *Bacillus* as Biocontrol Agent Against *Fusarium* wilt Disease of Lettuce

Jui-Chen Yao, and Chun-Yen Yeh

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of potential antagonist such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. on the *Fusarium* wilt of lettuce. Some isolate was selected in vitro and artificial infestation for their ability to inhibit the growth of *Fusarium. oxysporum*. We try to spray the spore suspension on soil surface after sowing, and use *Trichoderma* and *Bacillus* in seed priming medium, and by infestation of seeding medium and composting. The best potential method to suppress *Fusarium* wilt is to add the *Trichoderma* in sterilized seeding medium, then cultivate two weeks before transplant. By this method, the disease can be delay after planting in the field.

Key words : *Fusarium*, *Fusarium* wilt, biocontrol, *Trichoderma*, *Bacillus*, lettuce.